

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

\_\_\_\_\_ Д.Л.Пиневиц

«\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 г.

Регистрационный № 068-0519

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВНУТРИГЕННЫХ ДЕЛЕЦИИ  
В ГЕНЕ 1K2B1 ПРИ В-КЛЕТОЧНЫХ ОСТРЫХ  
ЛИМФОБЛАСТНЫХ ЛЕЙКОЗАХ  
У ДЕТЕЙ И «МОЛОДЫХ» ВЗРОСЛЫХ**

инструкция по применению

**УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:**

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии».

**АВТОРЫ:**

Вшивкова О.С., к.б.н. Мелешко А.Н.

Минск, 2019

В настоящей инструкции по применению (далее - инструкция) изложен метод определения внутригенных делеций в гене 1K2P1 при В-клеточных острых лимфобластных лейкозах (В-ОЛЛ) у детей и взрослых в возрасте старше 30 лет.

Метод может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику злокачественных новообразований лимфоидной, кроветворной и родственных им тканей (МКБ-10).

Инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-гематологов, врачей-онкологов и иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, проводящих диагностику и оказывающих медицинскую помощь пациентам с острым лимфобластным лейкозом в стационарных и/или амбулаторных условиях, и/или в условиях отделений дневного пребывания.

### **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (С91.0).

### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Нет.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИИ

В-ОЛЛ - В-клеточный острый лимфобластный лейкоз

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

дНТФ - нуклеозидтрифосфаты

КМ - костный мозг

ОЛЛ - острый лимфобластный лейкоз

ПК - периферическая кровь

п.о. - пар оснований

ПЦР - полимеразная цепная реакция

Тад-ДНК полимеразы - термостабильная ДНК-зависимая-ДНК-полимераза

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИИ, РЕАКТИВОВ И РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ**

Твердотельный амплификатор (термоциклер) с нагревающейся крышкой;  
Дозаторы для работы с объемами растворов в диапазоне от 0,1 до 200 мкл;  
Одноразовые наконечники объемом 10, 100 и 200 мкл с аэрозольным барьером для дозаторов;  
Центрифуга-вортекс;  
Эппендорфы объемом 0,2 мкл и 1,5 мл;  
Автоматизированный генетический анализатор (секвенатор) для проведения капиллярного электрофореза;  
Расходные материалы для автоматизированного генетического анализатора (секвенатора): 96-луночные планшеты и септы к ним;  
Морозильная камера с возможностью поддержания температуры (-20)°С;  
Программное обеспечение для визуализации результатов фрагментного анализа.

### **РЕАКТИВЫ**

Тад ДНК-полимераза;  
10X бесцветный буфер к Тад ДНК-полимеразе, включающий 20-25 мМ МдСЬ;  
Смесь дНТФ;  
Вода деионизованная;  
Флуоресцентно-меченные синтетические олигонуклеотиды (праймеры);  
Синтетические олигонуклеотиды (праймеры);  
Маркер молекулярного веса, меченный флуорофором КОХ, совместимый с автоматизированным генетическим анализатором, предназначенный для определения размеров фрагментов ДНК в диапазоне до 1000 п.о.;  
Формаид высокой степени очистки.

## ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Схема метода включает в себя следующие этапы:

1. Материал для исследования и требования к качеству ДНК
2. Типы внутригенных делеций гена GK2P1
3. Подбор праймеров для ПЦР и характеристика амплифицируемых фрагментов
4. Состав ПЦР реакции и условия термоциклирования
5. Подготовка ПЦР-продуктов и фрагментный анализ
6. Анализ результатов с использованием программного обеспечения

### **1. Материал для исследования и требования к качеству ДНК**

Материалом для получения ДНК при анализе внутригенных делеций GK2P1 служат мононуклеары костного мозга пациентов с В-ОЛЛ, выделенные на градиенте плотности.

ДНК из мононуклеаров костного мозга может быть получена любым удобным способом, в частности, методом фенол-хлороформной экстракции.

ДНК растворяют в ТЕ буфере (рН = 7,4 - 8,0) или воде, не содержащей нуклеаз, в термощейкере при 25-40° С в течение 1 часа. После инкубации раствор ДНК тщательно вортексируют, осаждают капли центрифугированием в течение нескольких секунд. Измерение концентрации ДНК выполняют на спектрофотометре в двух-трех повторах. Для каждого измерения выписывают значение концентрации, соотношение A260/A280 и A260/A230. Чистая ДНК имеет значение A260/A280 в диапазоне 1,7-2,0 и A260/A230 в диапазоне 2,0-2,3. Рабочий раствор ДНК должен иметь концентрацию 100-150 нг/мкл. Минимальной пороговой концентрацией является 10-15 нг/мкл.

В случае соответствия нормам данный материал принимают к исследованию.

### **2. Типы внутригенных делеций 1KXГ1**

Наиболее изученным и единственным клинически значимым типом aberrаций 1K2P1 при В-клеточных острых лимфобластных лейкозах (В-ОЛЛ) являются внутригенные делеции 15-200 тысяч пар оснований, приводящие к потере нескольких экзонов. Частота таких делеций при В-ОЛЛ по данным различных авторов колеблется от 8 до 15%, а при лейкозах с транслокацией БСК-АБЫ - до 80% случаев. Данный тип мутаций в функциональном отношении является *1088-0/-/ынсИоп*, т.е. приводит к потере или нарушению функции белка.

В свою очередь, нарушение функций белка, кодируемого геном GK2P1, во всех случаях выражается серьезными нарушениями дифференцировки и функций лимфоцитов, поскольку данный белок выполняет функцию транскрипционного фактора и осуществляет контроль Т- и В-клеточной дифференцировки и созревания лимфоцитов.

Клиническая значимость внутригенных делеций 1K2P1 уже не подлежит сомнению. Наличие внутригенных делеций 1K2P1 является одним из молекулярно-генетических маркеров, определяющих агрессивность течения лейкоза и повышающих риск развития рецидива этого заболевания.

Выявление внутригенных делеций 1K2P1 является неотъемлемым звеном лабораторной диагностики первичных В-ОЛЛ как в американских протоколах лечения [1, 2] так и в европейских клиниках, использующих протоколы лечения группы БРМ [3, 4]. Новый протокол лечения корпоративной группы Минск-Москва-Берлин (протокол МВ), который находится в стадии разработки, будет учитывать статус гена GK2P1 при стратификации пациентов на группы риска, что позволит подобрать им более эффективную схему лечения.

В зависимости от точек разрыва на хромосоме, можно выделить несколько типов внутригенных делеций 1K2P1 (рисунок 1). Наиболее часто (не менее 30% случаев всех внутригенных делеций) обнаруживается делеция с 3 по 6 экзоны (AEx3-6). Стабильность точек разрыва ДНК можно объяснить расположением в этих экзонах последовательностей, между которыми происходит ошибочная K88-рекомбинация при У(Б)1-реаранжировке про-В клеток из-за aberrантной активации  $Ka\delta 1/2$  генов (контроль над активностью которых осуществляет GK2P1).



Рисунок 1 - Схематичное изображение точек разрыва при четырех типах внутригенных делеций 1K2P1 (кодирующие экзоны схематично представлены в виде светло-серых прямоугольников, красные и зеленые прямоугольники символизируют домены типа «цинковых пальцев». ДНК-связывающие «цинковые пальцы» кодируются 3-5 экзонами (красные), 7 экзон кодирует два дополнительных «цинковых пальца» для белковых взаимодействий (зеленые).

Вторая распространенная делеция (15%) также происходит в результате aberrантной K88-рекомбинации и захватывает экзоны 1-6 (AEx1-6). Делеция, вероятнее всего, приводит к образованию нефункционального аллеля гена, поскольку 1 экзон включает в себя стоп-кодон АТО. Частота встречаемости других известных делеций (AEx1-7 и AEx3-7) по разным данным не превышает 4% [5, 6].

В настоящей инструкции изложен метод выявления четырех перечисленных выше типов внутригенных делеций GK2P1 с использованием мультиплексной ПЦР и фрагментного анализа продуктов ПЦР. Метод позволяет выявить большинство всех известных внутригенных делеций в данном локусе, однако, авторы не исключают, что в редких случаях метод может быть не чувствительным в отношении крайне редких делеций, точки разрыва при которых могут лежать за пределами зоны амплификации праймеров.

### **3. Подбор праймеров для ПЦР и характеристика амплифицируемых фрагментов**

Праймеры были сконструированы с использованием программного обеспечения таким образом, чтобы их можно было объединить в одной мультиплексной ПЦР, а длина ампликона и флуоресцентная метка позволяли идентифицировать каждую из четырех типов делеций, а также контрольный фрагмент ДНК. В качестве внутреннего контроля для оценки эффективности амплификации каждого конкретного образца был сконструирован обратный праймер (1p1x3\_K), специфичный к терминальной последовательности ДНК интрона 3. Праймер работает в паре с прямым праймером Ex3\_P, что позволяет амплифицировать фрагмент длиной 731 п.о., меченный флуоресцентной меткой УГС. Контрольный фрагмент должен амплифицироваться во всех анализируемых образцах и является доказательством присутствия ДНК в реакции, ее целостности, а также эффективной амплификации.

При отсутствии рассматриваемых делеций в гене праймеры находятся друг от друга на расстоянии более чем 10000 п.о., поэтому ПЦР невозможна.

При внутригенных делециях расстояние между праймерами не превышает 1000 п.о.

Таблица 1 - Последовательности праймеров для проведения мультиплексной ПЦР

Название	Последовательность 5' - 3'	Метка	Размер
Ex1a_P	CAACAAOTOACCCATCCTTTO	6-РАМ	21
Ex1B_P	CACACACTTCAAOTATATOCATTT	6-РАМ	24
Ex3_P	TOTOAAOOTSACACCCSTCTO	У1С	20
Ex6_K	AAA0AACCSTCAOOCATTTCA	-	20
Ex7_K	OOO0ASTO0AAOTCACA0AA	-	20
1п{г3_K	CACCTTOTOOTCCAOOSTA	-	19

Как видно в таблице 1, праймеры Ex1a\_P и Ex1B\_P помечены флуоресцентной меткой 6-РАМ (синий канал детекции), а праймер Ex3\_P помечен флуоресцентной меткой У1С (зеленый канал детекции). Все остальные праймеры немаркированные. Нет необходимости использовать именно указанные флуоресцентные метки. При выборе меток следуйте следующим рекомендациям:

- Выбирайте флуоресцентные метки в соответствии с калибровкой конкретного генетического анализатора (секвенатора), на котором будет проводиться фрагментный анализ продуктов ПЦР;
- Необходимо, чтобы каналы детекции двух флуоресцентных меток не перекрывались между собой;
- Необходимо, чтобы каналы детекции двух флуоресцентных меток не перекрывались с каналом детекции маркера молекулярного веса, который будет использован при фрагментном анализе.

Используя три канала флуоресценции (РАМ, У1С и КОХ) при анализе фрагментов вы получите (таблица 2):

1) перманентный зеленый пик (У1С) терминальной ДНК размером 731 п.о. (амплифицированный с помощью праймеров Ex3\_P и 1п1г3\_K). Этот пик всегда должен присутствовать при анализе, и позволяет вам быть уверенным, что ДНК была внесена в пробирку. **Обратите внимание, что при наличии делеции 1К2Е1 пик герминальной ДНК может быть очень низким или даже исчезнуть.**

2) в случае делеций с 3 по 6 или с 3 по 7 экзоны, вы получите зеленый пик (У1С) размером 120-230 п.о. (амплифицированный с праймером Ex3\_P и праймерами Ex6\_K или Ex7\_K).



3) в случае делеций с 1 по 6 или с 1 по 7 экзоны, вы получите синий пик (РАМ) размером 200-280 п.о. (амплифицированный с помощью праймеров Ex1a\_P или Ex1b\_P и праймеров Ex6\_K или Ex7\_K).

4) множественные красные пики (КОХ), соответствующие маркеру молекулярного веса.

Таблица 2 - Схема возможных взаимодействий праймеров в мультиплексной реакции, размер и тип продуктов амплификации

Прямой праймер	Обратный праймер	Размер продукта, п.о.	Тип делеции
Ex1a_P	Ex7_K	250-280	<b>АEx1-7</b>
Ex1b_P		200-240	<b>АEx1-6</b>
Ex3_P	Ex6_K	120-190	<b>АEx3-6</b>
	Ex7_K	200-230	<b>АEx3-7</b>
	1шт3_K	731	<b>Контроль</b>

#### 4. Состав ПЦР реакции и условия термоциклирования

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводят с использованием геномной ДНК надлежащего качества (см. пункт 1 «Материал для исследования и требования к качеству ДНК»). Для амплификации фрагментов используют шесть праймеров, последовательности которых приведены выше (таблица 1).

ДНК в количестве 50 нг амплифицируют в реакционном объеме 25 мл, содержащем 1X буфер для ПЦР, 1,5 мМ МдСЪ, 0,2 мМ смеси дНТФ, 0,4 мМ каждого праймера, 0,25 Ед ДНК-полимеразы с горячим стартом и воду, очищенную от нуклеаз.

ПЦР смесь раскапывают в отдельные 0,2 мл эппендорфы, вносят в каждый эппендорф 50 нг образца ДНК, герметично закрывают эппендорфы, перемешивают содержимое вортиксированием и осаждают центрифугированием в течение нескольких секунд. Загружают эппендорфы в ПЦР-блок. Протокол термоциклирования при использовании указанной ДНК-полимеразы следующий:

95°C - 4 мин  
 95°C 30 сек  
 60°C 30 сек к 30 циклов  
 72°C 1 мин  
 72°C - 4 ми  
 10°C ∞

При использовании ДНК-полимераз и реагентов разных производителей следует оптимизировать условия термоциклирования. В случае работы с полимеразой без горячего старта, ПЦР смесь следует готовить на льду, а ДНК-полимеразу вносить в смесь в последнюю очередь.

Перед проведением фрагментного анализа наличие и качество ПЦР-продуктов рекомендуется проверять в 2% агарозном геле, окрашенном этидиум бромидом.

## 5. Подготовка ПЦР-продуктов и фрагментный анализ

**Шаг 1:** Очистка образцов для фрагментного анализа не требуется. Продукт ПЦР следует развести в 10 раз в воде, не содержащей нуклеаз (таблица 2).

Таблица 2 - Разведение ПЦР продукта

Компонент смеси	Количество
ПЦР продукт	2 мкл
Вода, не содержащая нуклеаз	18 мкл

Разведенный ПЦР продукт тщательно перемешать, осадить центрифугированием и использовать в шаге 2. Разведенный ПЦР продукт можно хранить при -20°C в течение месяца, при -70°C длительное время.

**Шаг 2:** Перед разделением фрагментов в секвенаторе методом капиллярного электрофореза разведенный продукт ПЦР смешивают с высокоочищенным формамидом в соотношении 1:9 (таблица 3). Формамид действует как денатурирующий агент и обеспечивает хорошее разделение фрагментов ДНК во время денатурации.

Кроме того, в каждом образце обязательно должен присутствовать маркера молекулярного веса (стандарт длины), меченный флуорофором КОХ. Стандарт длины нужен для определения длин фрагментов ДНК методом экстраполяции.

Таблица 3 - Подготовка продукта ПЦР к фрагментному анализу

Компонент смеси	Количество
Разведенный ПЦР продукт	0,7 мкл
Формамид	9 мкл
Маркера молекулярного веса	0,3 мкл

Смесь тщательно перемешать, осадить центрифугированием и денатурировать при 98° С в течение 5 минут. Затем резко охладить до 4° С. Загрузить денатурированный образец (10 мкл) в лунку 96-луночного планшета, закрыть септой и загрузить в секвенатор. Провести капиллярный электрофорез.

Стандартные настройки секвенатора AppNeё Вювув^етв 3130 для проведения капиллярного электрофореза:

- Вольтаж пробега: 15000
- Вольтаж инъекции: 3000
- Мощность лазера: 15
- Время инъекции: 5 сек
- Давление в камере = ~7000+

#### **6. Анализ результатов фрагментного анализа с использованием программного обеспечения**

Фрагментный анализ представляет собой разделение фрагментов в секвенаторе методом капиллярного электрофореза и последующий анализ результатов в специальных программах. Для просмотра результатов фрагментного анализа разработано множество лицензионных продуктов, предназначены для анализа больших сложных мультилокусных систем (например, определение личности человека или отцовства), а также бесплатные версии программного обеспечения.

На рисунке 2 приведен пример визуализации 4 различных типов внутригенных делеций 1K2P1:

**1) Зеленый пик (У1С) размером около 120-190 п.о.** свидетельствует о наличии у пациента внутригенной делеции 1K2P1 с 3 по 6 экзоны (рисунок 2, а).

**2) Зеленый пик (У1С) размером около 200-230 п.о.** свидетельствует о наличии у пациента внутригенной делеции 1K2P1 с 3 по 7 экзоны (рисунок 2, б).

**3) Синий пик (ГАМ) размером около 200-240 п.о.** свидетельствует о наличии у пациента внутригенной делеции 1K2P1 с 1 по 6 экзоны (рисунок 2, в).

**4) Синий пик (ГАМ) размером около 250-280 п.о.** свидетельствует о наличии у пациента внутригенной делеции 1K2P1 с 1 по 7 экзоны (рисунок 2, г).

**5) Контрольный синий пик (ГАМ) размером около 730 п.о.** - фрагмент герминальной ДНК, должен амплифицироваться во всех анализируемых образцах и является доказательством присутствия ДНК в реакции, ее целостности, а также эффективной амплификации (рисунок 2, а, б). *Обратите внимание, что при наличии делеции 1КУЛ-1 пик герминальной ДНК может быть очень низким или даже исчезнуть (рисунок 2, в, г).*

100 160 220 280 340 400 460 520 580 640 700 760 820 Ър



Рисунок 2 - Пример фрагментного анализа различных типов внутригенных делеций ГК2Р1, амплифицированных с помощью метода мультиплексной ПЦР

6) **Отсутствие пиков в диапазоне от 200 до 300 п.о. по каналам ГАМ и У1С** свидетельствует об отсутствии у пациента внутригенных делеций ГК2Р1. В данном случае контрольный синий пик (РАМ) терминальной ДНК размером около 730 п.о. должен присутствовать в обязательном порядке.

7) **Множественные пики в красном канале (КОХ)** соответствуют фрагментам маркера молекулярного веса (не представлено на рисунке).

#### Список использованных источников

- 1) МиШДЪап С.О., 8и Х., 2пап§ 1. е\* а1. Ое1ейоп оГ ГК2Р1 апсС ргодшшв т аси\*е 1утрПоЪ1а8пс 1еикеш1а. N Еп§1 1 МесС 2009;360:470-80.
- 2) МиШдПап С.О. ТПе шолесилаг §епе\*ю шакеир оГ аси\*е 1утрПоЪ1а8йс Беикеппа Нета\*о1о§у Ат 8ос Нета\*о1 ЕсСис Ргодгат. 2012;2012:389-96. скл: 10.1182/азПеСисайоп-2012.1.389.
- 3) Кшрег К.Р., \УаапсСег8 Е., уап сСег УеШеп У.Н. е\* а1. ГК2Ш Селейоп8 рресЦс\* гелар8е т итГогтйу \*геа\*еС ресИа\*пс рресиг8ог В-А1Х. Беикеппа 2010;24(7):1258-64.
- 4) Ра1т1 С., Уа18ессы М.О., БопдтоШ О. е\* а1. \чш\* Г8 ТПе Ке1еуапсе ОГГкаго8 Оепе Ое1ейоп8 А8 А Рго§по8\*ю Магкег Гп РесИа\*пс РЫ1асСелрЫа-№ да\*^е В-Сел1 Рресиг8ог Аси\*е БутрПоЪ1а8\*1с Беикеппа? Наета\*о1од1са 2013;98:1226-31.

5) Мейер С., Шо гиг 8\*аС\*, Е8сПепсП О. е\* а1. Кейпетеп\* оГГК2Р1 гесотЪтайоп По\*8ро\*8 т рес11а\*пс ВСР-А1Х рапеп\*8. Ат 1 В1ооС Ке8 2013, 2013;3(2):165-173.

6) Вшивкова О.С., Мелешко А.Н. Роль транскрипционного фактора Iкагов в нормальном гемопоэзе и лейкогенезе: биологические и клинические аспекты // Успехи молекулярной онкологии, том 2, №1, 2015 г., стр. 13-16.

«УТВЕРЖДАЮ»

Первый заместитель Министра

Д.Л.Пиневиц

«12» \_\_\_\_\_ 2019 г.

Регистрационный № 068-0519



**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВНУТРИГЕННЫХ ДЕЛЕЦИЙ В ГЕНЕ  
1K2P1 ПРИ В-КЛЕТОЧНЫХ ОСТРЫХ ЛИМФОБЛАСТНЫХ  
ЛЕЙКОЗАХ У ДЕТЕЙ И «МОЛОДЫХ» ВЗРОСЛЫХ**

(инструкция по применению)

**УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:**

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический  
центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

**АВТОРЫ:**

Вшивкова О.С., к.б.н. Мелешко А.Н.

Минск, 2019